

REC'D 10 DEC 1999

WIPO PCT

09/582397

PCT/JP 99/05916

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

26.10.99

＝ＪＵ

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月26日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第304085号

出願人
Applicant(s):

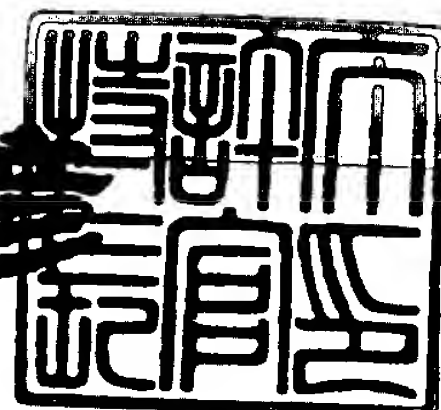
科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月26日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3081646

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA907483

【提出日】 平成10年10月26日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C12Q
C07K

【発明の名称】 新規 I κ B キナーゼ (I K K - i) 及びその遺伝子

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6-17-18-202

【氏名】 審良 静男

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府高石市取石 5 丁目 4-18

【氏名】 嶋田 高広

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書 1
【プルーフの要否】	要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規 I κ B キナーゼ (IKK- ι) 及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 若しくは 4 で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の 1 個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1 個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子 NF- κ B を活性化することができる蛋白質。

【請求項 2】 セリン／スレオニンキナーゼである請求項 1 に記載の蛋白質。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子。

【請求項 4】 塩基配列が、配列番号 1 又は 3 で表される塩基酸配列を有する請求項 3 に記載の遺伝子。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物。

【請求項 6】 免疫応答機構に作用する請求項 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な I κ B キナーゼ、その遺伝子及び医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子 NF- κ B を活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規 I κ B キナーゼ IKK- ι に関する。

【0002】

【従来の技術】

マクロファージは生体防御において重要な役割を果たしており細菌感染や悪性腫瘍の浸潤に対し、食食、抗原提示、などの機能を果たすことが知られている。またマクロファージはリポポリサッカライド (LPS) や炎症性サイトカインによって活性化され、主要組織適合抗原、TNF- α (tumor necros

is factor- α)、IL-1 β (interleukin-1 β)、IL-6 (interleukin-6)、MIP-1 α/β (macrophage inflammatory protein-1 α/β)などの免疫応答に関わる種々の遺伝子を発現することが知られている。

【0003】

NF- κ Bは免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子である。

LPS、TNF- α 、IL-1 β などによって活性化され、TNF- α 、IL-1 β 、I κ B- α など免疫応答に重要な遺伝子の転写がNF- κ Bの支配を受けていることが知られている。

われわれは免疫応答に関わる新規遺伝子を同定するため、マクロファージ系腫瘍株であるRAW264.7のLPS刺激(+)群と(-)群との間でサブトラクションを施行した。得られた遺伝子のうちクローン#2F9は、最近同定されNF- κ Bを活性化することが知られているI κ Bキナーゼ- α 、 β (I κ B kinase- α 、 β) (DiDonato JA, et al., Nature 1997 Aug 7;388(6642):548-554 ; Zandi E, et al., Cell 1997 Oct 17;91(2):243-252 ; Mercurio F, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):860-866 ; Woronicz JD, et al., Science 1997 Oct 31;278(5339):866-869 ; Regnier CH, et al., Cell 1997 Jul 25;90(2):373-383) とホモロジーを持つ新規遺伝子であることが明らかになり、われわれはこの新規遺伝子がコードする蛋白質をIKK-i (inducible-I κ B kinase) と命名した。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

本発明者らは、IKK-iはI κ B- α をリン酸化しNF- κ Bを活性化する新規セリン/スレオニンキナーゼであることを証明し、その発現が種々の炎症性

サイトカインにより誘導されることを明らかにした。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、配列番号2若しくは4で表されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸が欠失し、他のアミノ酸で置換され、及び／又は、1個以上の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、転写因子NF- κ Bを活性化することができる蛋白質に関する。本発明の蛋白質は新規なセリン／スレオニンキナーゼである。

【0006】

また、本発明は、前記の新規な蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、配列番号1又は3で表される塩基配列を有する遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した蛋白質、及び、製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、転写因子NF- κ Bを活性化することができ免疫応答機構に作用する。

【0007】

まず、本発明のIKK-iのcDNAクローニングについて説明する。

サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法 (suppression subtractive hybridization technique) を用いて、マクロファージ系腫瘍株であるRAW264.7のリポポリサッカライド (LPS) 刺激における(+)群と(-)群との間でサブトラクションを施行し、LPS刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。MIP-1 α / β 、G-CSF、TNF- α などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。

【0008】

このうちクローン#2F9は、刺激を加えないRAW264.7ではわずかに発現を認めるのみだが4時間のLPS刺激後、劇的に発現量が増加した(図1参照)。図1は、マクロファージ系腫瘍株RAW264.7をリポポリサッカライド (LPS) で刺激して誘導されてくる遺伝子のノザンブロット解析を示したものである。RAW264.7のLPS (100 ng/ml) 刺激前(-)後(+)

) のポリ(A)⁺ RNA 2 μ g を 1% フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、サブトラクションで得られた IKK- α の cDNA フラグメント (2F9) をプローブに用いてハイブリダイズさせた。RNA 量が等量であることを G3PDH を用いて図 1 の下段に示した。

【0009】

また、この mRNA の発現の時間経過を調べると、LPS 刺激後 2 時間から増加し始め、4 時間でピークに達し 24 時間でもとのレベルに戻った (図 2 参照)。

図 2 は、RAW 264.7 を 100 ng/ml の LPS で刺激し、各レーン上に示した時間の後にトータル RNA を抽出し 25 μ g ずつ 1% フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、図 1 の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはマウス IKK- α (mIKK- α) のコーディング領域を用いた。RNA 量が等量であることを G3PDH を用いて図 2 の下段に示した。

【0010】

RAW 264.7 を 4 時間 LPS 刺激して得た mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、2F9 のフラグメントをプローブとしてこの遺伝子の全長を得た。この遺伝子は 2154 bp の open reading frame に 718 アミノ酸をコードしていた。ホモロジー検索の結果、データベース上では塩基配列のみが決定され機能が未知のヒト cDNA クローン KIAA0151 と最もホモロジーが高く、相同性はアミノ酸レベルで 82.3% であり 2F9 は KIAA0151 のマウスのカウンターパートであると考えられた。

KIAA0151 に次いで相同性の高かった遺伝子は、最近同定され IKK- α をリン酸化し NF- κ B を活性化することが明らかになった IKK キナーゼ- α , β (IKK- α , IKK- β) であり、キナーゼドメインの相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ 29.1%, 30.1% であった。

【0011】

2F9、KIAA0151 にはともに N 末端にセリン/スレオニンキナーゼドメイン、中央にロイシンジッパードメインが 2 つ認められ、IKK- α 、IKK

— β との構造の類似性と後に述べるこの分子の機能から、本発明者らはこの新規キナーゼを *inducible-IKK (IKK-i)* と命名した。

【0012】

ヒト *IKK-i* とマウス *IKK-i* のアミノ酸配列の比較を図3に、ヒト *IKK-i*、ヒト *IKK- α* 、ヒト *IKK- β* のアミノ酸配列の比較を図4に示した。

図3では、同一の配列を長方形で囲んでおり、キナーゼドメインを [] で示した。また、ロイシンジッパードメインの下に * 印を記している。

図4では、同一の配列のバックをグレーに配色し、キナーゼドメインを [] で示している。アクチベーションループを長方形で囲んでおり、アクチベーションループの配列でキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基の上に * 印を記している。*IKK- α* 、*IKK- β* のヘリックスループ-ヘリックス構造の下にアンダーラインを引いている。

【0013】

次に本発明者らは、各臓器における *IKK-i* の発現をノザンブロットで解析した。*IKK- α* 、*IKK- β* がどの組織にも普遍的に発現しているのに対し *IKK-i* の mRNA は脾臓、胸腺、抹消血白血球、脾臓、胎盤に特異的に多く発現していた (図5参照)。図5の各レーン上に記された臓器から得られたポリ(A)⁺RNA 2 μ g がプロットされたマルチティッシュノザンブロットメンブレン (Clontech) を用いてノザンブロット解析を行った。プローブはヒト *IKK-i* (h *IKK-i*) のコーディング領域を用いた。

【0014】

脾臓で認められる *IKK-i* の発現がどの細胞集団に由来するものなのかを調べるために、抗 B220 抗体を使って B-細胞と T-細胞を分離し、B-細胞は LPS の刺激前 (-) 後 (+) で、T-細胞はフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激前 (-) 後 (+) でそれぞれ *IKK-i* の発現をノザン解析した。B-細胞では LPS 刺激しなければ検出できないが、LPS 刺激により発現が誘導された。T-細胞では構成的に発現しているがフォルボールエステルとカルシウムイオノフォアの刺激により発現が低下した (図6参照)。

【0015】

図6は、C57BL/6から採取した脾細胞から抗体(B220)を用いて、高勾配磁気細胞分離装置(high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によってB-細胞とT-細胞を分離し、B-細胞はLPS: $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、T-細胞はイオノマイシン: $10 \mu\text{M}$ とPMA: $10 \text{ ng}/\text{ml}$ で4時間刺激し、各刺激の前後でトータルRNAを抽出し $20 \mu\text{g}$ ずつ、1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し図2の場合と同様にノザンプロット解析を行った。プローブはマウスIKK- α (mIKK- α) のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて図6の下段に示した。

【0016】

次に、いくつかのマウスの細胞株におけるIKK- α の発現をLPS刺激前(ー)後(+)で解析した。5E3 (natural killer cell clone) とM1 (Monocytic leukemia cell line) においてLPS刺激によってIKK- α の発現が誘導された(図7参照)。

【0017】

図7の各レーン上に記された腫瘍株NIH3T3 (fibroblast cell line)、EL-4 (thymoma cells)、5E3 (natural killer cell clone)、MOPC 315 (myeloma cells)、BCL-1 (B cell leukemia)、M1 (monocytic leukemia cell line) から、4時間のLPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) 刺激前(ー)後(+)でトータルRNAを抽出し図2の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果である。プローブはmIKK- α のコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータルRNAの電気泳動像を用いて図7の下段に示した。

【0018】

さらに、LPS以外の刺激によってもIKK- α の発現が増強するの可否かを検討した。C57BL/6から採取した腹腔マクロファージをLPS、PMA、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6によって4時間刺激した後にIKK- α の発現を見た。IKK- α はLPS以外にもTNF- α 、IL-1 β 、

IFN- γ 、IL-6によっても発現が誘導されたがPMAによっては誘導されなかった(図8参照)。

【0019】

図8は、C57BL/6から採取した腹腔マクロファージを、図8の各レーン上に示した様にLPS: $1\mu\text{g/ml}$ 、PMA: 10ng/ml 、TNF- α : 100ng/ml 、IL-1 β : 100ng/ml 、IFN- γ : 250U/ml 、IL-6: 2000U/ml で刺激後トータルRNAを抽出し図2の場合と同様にノザンプロット解析を行った結果を示したものである。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。RNA量が等量であることをG3PDHを用いて図8の下段に示した。

【0020】

IKK- α 、IKK- β は細胞内に強制発現させるとNF- κ Bを活性化することがレポータージーンアッセイにより証明されている。IKK-iにおいてもその構造の類似性からNF- κ Bを活性化する可能性があると考えことから、レポータージーンアッセイによりIKK-iのNF- κ B活性化能を検討した。

まず、IKK-iのN-末端にFLAGエピトープをタグしpEF-BOS発現ベクターに組み込んだ構築を作製した(pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i)。pEF-BOS-FLAG-IKK-iまたはベクターのみのコントロールをNF- κ Bのルシフェラーゼレポーターコンストラクトと293T細胞に一過性にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。この結果、IKK-iはその発現量依存性にNF- κ Bを活性化することが明らかになった(図9参照)。

【0021】

図9は、293T細胞に、NF- κ Bコンセンサスシーケンスにルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターコンストラクト(pNF- κ B-Luc)と、IKK-i遺伝子のN-末端にFLAGエピトープをタグしpEF-BOS発現ベクターにサブクローンしたコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i)またはベクターのみのコントロールを一過性にコトランスフェクションしルシフェラーゼ活性を測定した結果を示したものである。総DNA量はp

EF-BOS-ベクターによって4 μ gに統一した。トランスフェクトしたpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iの量をグラフの下に示し、図9の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミューブロットにより評価したものを示す。

【0022】

IKK- α 、IKK- β はインビトロでI κ B- α をリン酸化することが知られている。そこで、本発明のIKK-iが、I κ B- α のN末端に存在する32番目と36番目のセリン残基をリン酸化するの可否かをインビトロキナーゼアッセイ(in vitro kinase assay)により解析した。

pEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i又はIKK-iの38番目のリジンをアラニンに変化させたミュータントコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i)を293T細胞に一過性にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体(M2)によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。

【0023】

基質として、I κ B- α のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I κ B- α Nタンパク(WT)、またはGST-I κ B- α Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたGST-I κ B- α Nタンパク(AA)を用いた。約80kDaにIKK-iの自己リン酸化のバンドがBOS-FLAG-WT-IKK-iのレーンに認められた。IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(WT)をリン酸化したが、K38A-IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(WT)をリン酸化しなかった。また、IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(AA)を全くリン酸化しなかった(図10参照)。

【0024】

図10は、インビトロ(in vitro)でのIKK-iによるI κ B- α のリン酸化の結果を示したものである。293T細胞にpEF-BOS-MOCKまたはpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iまたは38番目のリジンをアラニ

ンに変化させたミュータントコンストラクト (pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i) を一過性にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体 (M2) によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイに用いた。基質としてI κ B- α のアンキリンリピートよりC-末端をとりのぞいたGST-I κ B- α Nタンパク (WT)、またはGST-I κ B- α Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンに変えたタンパク (AA) を大腸菌に発現させグルタチオンセファロースで精製したものをを用いた。IKK-iまたはK38A-IKK-iと基質と [γ - 32 P] ATPを30℃、20分間反応させた後SDS-PAGEに展開後オートラジオグラフィにて評価した。矢印で自己リン酸化のバンドとGST-I κ B- α Nのバンドを示した。分子量 (単位kDa) を左に示した。図10の下段にタンパク量を抗FLAG抗体 (M2) によるイミュノブロットにより評価した結果を示した。

【0025】

以上の結果から、本発明のIKK-iは、NF- κ Bの活性化に重要なI κ BのN末端に存在するセリン残基をリン酸化することが明らかになった。

【0026】

本発明のIKK-iのcDNAクローニングの結果明らかにされた塩基配列及びそのアミノ酸配列を配列表に示す。配列番号1はヒトIKK-i (hIKK-i) の塩基配列を示しており、配列番号2はhIKK-iのアミノ酸配列を示している。また、配列番号3はマウスIKK-i (mIKK-i) の塩基配列を示しており、配列番号4はmIKK-iのアミノ酸配列を示している。

【0027】

本発明のIKK-iは、N末端にキナーゼドメインを、中央にロイシンジッパードメインを有する新規のセリン/スレオニンキナーゼであり、そのmRNAの発現はマクロファージにおいてLPS刺激によって誘導されることが明らかになった。本発明のIKK-iのアミノ酸配列は、I κ Bをリン酸化し、NF- κ Bを活性化するIKK- α 、IKK- β と高い相同性を示した。

【0028】

本発明の IKK-i は、脾臓、胸腺、末梢血白血球などに構成的に発現しており、脾臓では T-細胞に構成的に発現していた。また B-細胞、腹腔マクロファージ、ナチュラルキラー (natural killer) 細胞、モノサイト系腫瘍株を LPS 刺激すると発現が増強し、腹腔マクロファージを TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6 で刺激することによっても発現が増強した。これらのノザン解析の結果から、IKK-i の発現が、主に免疫担当細胞や炎症反応に関わる細胞に偏っており、炎症性の刺激により増強したことから IKK-i は炎症反応に関わる分子であると考えられる。

【0029】

IKK-i の NF- κ B 活性能をレポータージーンアッセイによって解析したところ、293 T 細胞に IKK-i を強制発現すると蛋白量依存性に NF- κ B が活性化されることが明らかになった。IKK-i は IKK- α 、IKK- β と同様に I κ B- α の N 末端に存在するセリン残基をリン酸化することがインビトロキナーゼアッセイで明らかになったので、レポータージーンアッセイで観察された NF- κ B 活性能は、IKK-i が I κ B- α の N 末端をリン酸化することに依存するものであると考えられた。IKK-i は免疫担当細胞において炎症性の刺激により発現が誘導され、NF- κ B を活性化する新規な I κ B キナーゼであることがわかった。

【0030】

本発明の IKK-i は、LPS 刺激 2 時間後から発現量が増加すること、発現量依存性に NF- κ B を活性化することから、LPS 刺激による NF- κ B の活性化の維持に貢献している可能性がある。IKK-i は IKK- α 、IKK- β と比べその発現が免疫担当細胞に偏っているため、そのインヒビターの開発は免疫系特異的に NF- κ B の活性化を抑制できる可能性があり、IKK-i のコントロールは炎症性疾患の治療に貢献できることになる。

このように IKK-i は臨床的な観点からも非常に興味深い分子であると考え
る。

【0031】

本発明の医薬組成物は、IKK-i と製薬上許容される担体とからなるもので

あり、投与可能な形態として投与することができる。投与量は患者の状態に応じて適宜選択することができる。

本発明の医薬組成物は、免疫応答機能の改善や炎症性疾患の治療に有効である。

【0032】

【実施例】

次に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0033】

実施例1 (mIKK-iのcDNAクローニング)

サプレッションサブトラクティブハイブリダイゼーション法 (suppression subtractive hybridization technique) を用いて、マクロファージ系腫瘍株である RAW264.7 の LPS 100 ng/ml での刺激 (+) 群と (-) 群との間でサブトラクションを施行し、LPS 刺激により誘導されてくる遺伝子のスクリーニングを行った。

その結果、MIP-1 α/β 、G-CSF、TNF- α などの既知遺伝子に加え、7つの新規遺伝子のフラグメントを得た。7つの新規遺伝子のうちクローン #2F9 は 374 bp の遺伝子断片であった。クローン #2F9 の遺伝子の全長を得るため、我々はまず、RAW264.7 を 4 時間 LPS 刺激して得た mRNA から λ ZAP ファージを用いて cDNA ファージライブラリーを作製した。2F9 の 374 bp のフラグメントをランダムラベリング法にて α - 32 P-dCTP で標識し、標識された 2F9 をプローブとして、cDNA ファージライブラリーをスクリーニングして遺伝子の全長を得た。

得られたクローンの全長は 2910 bp であった。この遺伝子は 2151 bp のオープンリーディングフレーム (open reading frame) に 717 個のアミノ酸をコードしていた。この遺伝子の塩基配列を配列番号 3 に示す。

また、そのアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。

【0034】

実施例2 (hIKK-iのcDNAクローニング)

既にDDBJに登録されていた塩基配列KIAA0151をもとにして、ヒト胎盤のcDNAライブラリーをテンプレートとしてPCR法により、ヒトのIKK-iのcDNAをクローニングした。このときのPCR法に用いたプライマーの配列は、

5'-ctttgcctgactcagggcagctcagag-3'、及び、

5'-atggtgcagaagagcagtgttgaatc-3'であった。

この遺伝子は、2148bpのオープンリーディングフレーム(open reading frame)に716個のアミノ酸をコードしていた。この遺伝子の塩基配列を配列番号1に示す。また、そのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0035】

実施例3 (LPS刺激によるクローン#2F9の発現)

マクロファージ系腫瘍株RAW264.7をリポポリサッカライド(LPS)で刺激して誘導されてくる遺伝子のノザンブロット解析を行った。

RAW264.7のLPS(100ng/ml)刺激前(-)後(+)のポリ(A)⁺RNA 2μgを1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、サブトラクションで得られたIKK-iのcDNAフラグメントをプローブに用いてハイブリダイズさせた。

結果を図1に示す。なお、RNA量が等量であることをG3PDHを用いて図1の下段に示した。

【0036】

実施例4 (LPS刺激によるクローン#2F9の発現の時間経過)

RAW264.7を100ng/mlのLPSで刺激し、0.5時間、2時間、4時間、8時間、12時間、及び、24時間経過後にトータルRNAを抽出し、25μgずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動し、実施例3と同様にノザンブロット解析を行った。プローブは実施例2で得られたマウスIKK-i(mIKK-i)のコーディング領域を用いた。

結果を図2に示す。なお、RNA量が等量であることをG3PDHを用いて図2の下段に示した。

【0037】

実施例5 (IKK-iの発現)

各臓器におけるIKK-iの発現をノザンブロットで解析した。

各臓器から得られたpoly(A)⁺RNA 2 μgがプロットされたマルチティッシュノザンブロットメンブレン (Clontech) を用いてノザンブロット解析を行った。プローブはhIKK-iのコーディング領域を用いた。

結果を図5に示す。図5中の矢印は、IKK-iの位置を示している。

【0038】

実施例6 (脾臓におけるIKK-iの発現)

C57BL/6から採取した脾細胞から抗体 (B220) を用いて、高勾配磁気細胞分離装置 (high-gradient magnetic cell separation system) MACS (Miltenyi Biotec, Berg.-Gladbach, Germany) によってB-細胞とT-細胞を分離した。B-細胞はLPS: 100 μg/ml、T-細胞はイオノマイシン: 10 μMとPMA: 10 ng/mlで4時間刺激し、各刺激の前後でトータルRNAを抽出し20 μgずつ1%フォルムアミド-アガロースにて電気泳動させて、実施例4と同様にノザンブロット解析を行った。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。

結果を図6に示す。なお、RNA量が等量であることをG3PDHを用いて図6の下段に示した。

【0039】

実施例7 (マウスの細胞におけるIKK-iの発現)

マウスの細胞株、腫瘍株NIH3T3 (fibroblast cell line)、EL-4 (thymoma cells)、5E3 (natural killer cell clone)、MOPC315 (myeloma cells)、BCL-1 (B cell leukemia)、及び、M1 (monocytic leukemia cell line) のそれぞれに、LPS (100 ng/ml) 刺激前 (-) 及び4時間のLPS刺激後 (+) のトータルRNAを抽出し、実施例4と同様にノザンブロット解析を行った。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。

結果を図7に示す。なお、RNA量が等量であることを、エチジウムブロマイドで染色したトータルRNAの電気泳動像を用いて図7の下段に示した。

【0040】

実施例8（腹腔マクロファージにおけるIKK-iの発現）

C57BL/6から採取した腹腔マクロファージを、LPS: $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、PMA: $10\text{ng}/\text{ml}$ 、TNF- α : $100\text{ng}/\text{ml}$ 、IL-1 β : $100\text{ng}/\text{ml}$ 、IFN- γ : $250\text{U}/\text{ml}$ 、IL-6: $2000\text{U}/\text{ml}$ でそれぞれ刺激した後、トータルRNAを抽出し、実施例4と同様にノザンプロット解析を行った。プローブはmIKK-iのコーディング領域を用いた。結果を図8に示す。図8中の（-）は刺激をしなかった場合を示している。なお、RNA量が等量であることをG3PDHを用いて図8の下段に示した。

【0041】

実施例9（IKK-i発現ベクターの構築）

IKK-i遺伝子のN-末端にFLAGエピトープを結合させた。FLAG-hIKK-iフラグメントの5'端と3'端に制限酵素SalIサイトをつくり、次に示すプライマー配列1①及び②を用いて、

【0042】

①5'-gggtcgacca ccatggacta caaggacgac gatgacaaga tgcagagcac agccaat-3'

②5'-gtcgactcag accatcagga ggtgc-3'

PCR法にて作成した。これをT-ベクター（pGEM-T）（Promega）にサブクローン後、制限酵素SalIで切り出して、pEF-BOS発現ベクターへサブクローンして、発現ベクターpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iを構築した。

【0043】

実施例10（IKK-iによるNF- κ Bの活性化）

293T細胞 3×10^5 個に、NF- κ Bコンセンサスレポーターコンストラクト（pNF- κ B-Luc）（Stratagene社製）と、実施例9で得たIKK-i発現ベクターpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-iを、それぞれ $0\mu\text{g}$ （添加無し）、 $0.3\mu\text{g}$ 、 $1.0\mu\text{g}$ 、 $3.0\mu\text{g}$ 加えて、一過性にトランスイットLT-1（Transit LT-1）（Pan Vera Corporation社製）を用いたリポフェクション法によりコトランスフェクションし、プ

ロメガ (Promega) 社製のデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Dual Luciferase Reporter assay system) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、コントロールとしてベクターのみを添加したものをを用いた。

総DNA量は pEF-BOS-ベクターによって4 μ gに統一した。

結果を図9に示す。なお、図9の下段にタンパク量を抗FLAG抗体 (M2) によるイミューノブロットにより評価したものを示した。

【0044】

実施例11 (IKK-iの38番目のリジンをアラニンにした変異体の製造)

ポイントミューテーションにより、IKK-iの38番目のリジンをコードしている塩基を、アラニンをコードする塩基にして、IKK-iの変異体の遺伝子を作成した。ポイントミューテーションは、トランスフォーマー・サイト・ディレクティッドミュータゲネシスキット (Clontech) を用いた。

【0045】

実施例12 (IKK-iの変異体の発現ベクターの構築)

実施例11で得た変異体の遺伝子を用いて、実施例9と同様にして変異体の発現ベクター pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i を構築した。

【0046】

実施例13 (GST-I κ B- α Nタンパク (WT) の製造)

I κ B- α のアンキリンリピートよりC-末端部分を切断したアミノ酸配列1~72をコードする遺伝子を製造し、これを大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースで精製してGST-I κ B- α Nタンパク (WT) を得た。ベクターとしてはファルマシア社製の pGEX2T を用いた。

【0047】

実施例14 (GST-I κ B- α Nタンパク (AA) の製造)

GST-I κ B- α Nの32番目と36番目のセリン残基をどちらもアラニンをコードする塩基に変えた遺伝子を製造して、これを大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースで精製したGST-I κ B- α Nタンパク (AA) を得た。

【0048】

実施例15 (IKK-iによるI κ B- α のセリン残基をリン酸化)

293T細胞 2×10^6 個に、pEF-BOS-MOCK、実施例9で得たpEF-BOS-FLAG-WT-IKK-i、又は、実施例12で得たミュータントコンストラクト(pEF-BOS-FLAG-K38A-IKK-i)をそれぞれ用いて、10cm ディッシュ(dish)上で一過性にトランスフェクションした。24時間後に発現されたIKK-iタンパクまたはK38A-IKK-iタンパクを抗FLAG抗体(M2)によって免疫沈降により精製し、インビトロキナーゼアッセイを行った。

インビトロキナーゼアッセイの基質として、実施例14で得たGST-I κ B- α Nタンパク(WT)、又は、実施例15で得たタンパク(AA)を用いた。IKK-iまたはK38A-IKK-iと基質と $[\gamma-^32\text{P}]$ ATPを30℃、20分間反応させた後SDS-PAGEに展開後オートラジオグラフィにて評価した。

結果を図10に示す。図10中の約80kDaの位置の矢印は、自己リン酸化のバンドを示し、その下の矢印はGST-I κ B- α Nのバンドを示す。分子量(単位kDa)を図10の左側に示している。なお、図10の下段にタンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミューブロットにより評価した結果を示した。

この結果、IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(WT)をリン酸化したが、K38A-IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(WT)をリン酸化しなかった。また、IKK-iはGST-I κ B- α Nタンパク(AA)を全くリン酸化しなかった。

【0049】

【発明の効果】

本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン/スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供するものである。本発明のIKK-iはI κ B- α をリン酸化しNF- κ Bを活性化することから、この遺伝子を制御することは、免疫応答機構の改

善や炎症性疾患の治療に有用である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Novel I κ B-kinase (IKK-i) and its gene encoded.

<130> PA907483

<160> 4

<210> 1

<211> 2154

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

agatgcagag cacagccaat tacctgtggc acacagatga cctgctgggg cagggggcca	60
ctgccagtgt gtacaaggcc cgcaacaaga aatccggaga gctggttgct gtgaaggtct	120
tcaacactac cagctacctg cggccccgcg aggtgcaggt gagggagttt gaggtcctgc	180
ggaagctgaa ccaccagaac atcgtcaagc tctttgcggt ggaggagacg ggcggaagcc	240
ggcagaaggt actggtgatg gagtactgct ccagtgggag cctgctgagt gtgctggaga	300
gccctgagaa tgcctttggg ctgcctgagg atgagttcct ggtgggtgctg cgctgtgtgg	360
tggccggcat gaaccacctg cgggagaacg gcattgtgca tcgcgacatc aagccgggga	420
acatcatgcg cctcgtaggg gagggaggggc agagcatcta caagctgaca gacttcggcg	480
ctgcccggga gctggatgat gatgagaagt tcgtctcggt ctatgggact gaggagtacc	540
tgcatcccga catgtatgag cgggcggtgc ttcgaaagcc ccagcaaaaa gcgttcgggg	600
tgactgtgga tctctggagc attggagtga ccttgtacca tgcagccact ggcagcctgc	660

ccitcatccc ctttggtggg ccacggcgga acaaggagat catgtaccgg atcaccacag	720
agaagccggc tggggccatt gcaggtgccc agaggcggga gaacgggccc ctggagtgga	780
gctacaccct ccccatcacc tgccagctgt cactggggct gcagagccag ctggtgccc	840
tcctggccaa catcctggag gtggagcagg ccaagtgtg gggcttcgac cagttctttg	900
cggagaccag tgacatcctg cagcagattg tcgtccatgt cttctccctg tcccaggcag	960
tcctgcacca catctatac catgcccaca acacgatagc cattttccag gaggccgtgc	1020
acaagcagac cagtgtggcc ccccgacacc aggagtacct ctttgagggt cacctctgtg	1080
tcctcgagcc cagcgtctca gcacagcaca tcgcccacac gacggcaagc agccccctga	1140
ccccttcag cacagccaic cctaaggggc tggccttcag ggacctgct ctggacgtcc	1200
ccaagttcgt ccccaaagtg gacctgcagg cggattacaa cactgccaaag ggcgtgttg	1260
gcgccggcta ccaggccctg cggctggcac gggccctgct ggatgggcag gagctaagt	1320
ttcgggggct gcactgggtc atggaggtgc tccaggccac atgcagacgg actctggaag	1380
tggcaaggac atccctcctc tacctcagca gcagcctggg aactgagagg ttcagcagcg	1440
tggctggaac gcctgagatc caggaactga aggcggtgc agaactgagg tccaggctgc	1500
ggactctagc ggaggtcctc tccagatgct cccaaaatat cacggagacc caggagagcc	1560
tgagcagcct gaaccgggag ctggtgaaga gccgggatca ggtacatgag gacagaagca	1620
tccagcagat tcagtgtgt ttggacaaga tgaacttcac ctacaaacag ttcaagaagt	1680
ctaggatgag gccagggtt ggctacaacg aggagcagat tcacaagctg gataaggtga	1740
atttcagtca tttagccaaa agactcctgc aggtgttcca ggaggagtgc gtgcagaagt	1800
atcaagcgtc cttagtcaca cacggcaaga ggatgagggt ggtgcacgag accaggaacc	1860
acctgcgcct ggttggctgt tctgtggctg cctgtaacac agaagcccag ggggtccagg	1920
agagtctcag caagctcctg gaagagctat ctcaccagct ctttcaggac cgagcaaagg	1980
gggtcaggc ctcgccgcct cccatagctc cttaccccag ccctacacga aaggacctgc	2040
ttctccacat gcaagagctc tgcgagggga tgaagctgct ggcatctgac ctctggaca	2100
acaaccgcat catcgaacgg ctaaataagag tcccagcacc tcctgatgtc tgag	2154

<210> 2

<211> 716

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Gln Ser Thr Ala Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu	15
Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys	30
Ser Gly Glu Leu Val Ala Val Lys Val Phe Asn Thr Thr Ser Tyr	45
Leu Arg Pro Arg Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg	60
Lys Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu	75
Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Val Met Glu Tyr Cys Ser	90
Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Ser Pro Glu Asn Ala Phe	105
Gly Leu Pro Glu Asp Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Thr Asp Phe Gly Ala Ala Arg Glu Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ala Gly Ala Gln Arg Arg Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Thr Leu Pro Ile Thr Cys Gln Leu Ser	270
Leu Gly Leu Gln Ser Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Gln Ala Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Val Val Val His Val Phe Ser	315
Leu Ser Gln Ala Val Leu His His Ile Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Gln Glu Ala Val His Lys Gln Thr Ser Val	345
Ala Pro Arg His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Leu Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Val Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Thr Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Thr Ala Ile Pro Lys Gly Leu	390
Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val Pro Lys	405

Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Asn Thr Ala Lys Gly Val Leu Gly	420
Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Arg Leu Ala Arg Ala Leu Leu Asp Gly	435
Gln Glu Leu Met Phe Arg Gly Leu His Trp Val Met Glu Val Leu	450
Gln Ala Thr Cys Arg Arg Thr Leu Glu Val Ala Arg Thr Ser Leu	465
Leu Tyr Leu Ser Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser Ser Val	480
Ala Gly Thr Pro Glu Ile Gln Glu Leu Lys Ala Ala Ala Glu Leu	495
Arg Ser Arg Leu Arg Thr Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser	510
Gln Asn Ile Thr Glu Thr Gln Glu Ser Leu Ser Ser Leu Asn Arg	525
Glu Leu Val Lys Ser Arg Asp Gln Val His Glu Asp Arg Ser Ile	540
Gln Gln Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met Asn Phe Ile Tyr Lys	555
Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Gly Tyr Asn Glu	570
Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser His Leu Ala	585
Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val Gln Lys Tyr	600
Gln Ala Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg Val Val His	615
Glu Thr Arg Asn His Leu Arg Leu Val Gly Cys Ser Val Ala Ala	630
Cys Asn Thr Glu Ala Gln Gly Val Gln Glu Ser Leu Ser Lys Leu	645
Leu Glu Glu Leu Ser His Gln Leu Leu Gln Asp Arg Ala Lys Gly	660
Ala Gln Ala Ser Pro Pro Pro Ile Ala Pro Tyr Pro Ser Pro Thr	675
Arg Lys Asp Leu Leu Leu His Met Gln Glu Leu Cys Glu Gly Met	690
Lys Leu Leu Ala Ser Asp Leu Leu Asp Asn Asn Arg Ile Ile Glu	705
Arg Leu Asn Arg Val Pro Ala Pro Pro Asp Val ***	716

<210> 3

<211> 2910

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 3

gaattcggca cgagaagata gccaaagccca ggagatgcag agtaccacta actacctgtg	60
gcatactgat gacctgctag ggcagggggc cactgccagt gtgtacaagg cccgaaacaa	120

gaaatccggg gaggtggttg ctgtaaaggt cttcaactca gccagctatc ggcgacctcc	180
tgaggttcag gtgaggaggt ttgaggctct gcggaggctg aatcaccaga acatcgtgaa	240
gctattcgca gtggaggaaa cgggaggcag ccggcagaag gtgctaata tggagtactg	300
ctccagtggg agcctgctga gcgtgctgga agaccctgag aacacgttcg ggctttctga	360
agaggagttc ctagtggtgc tgcgctgtgt ggtggctggc atgaaccacc tgcgggagaa	420
tggcattgtc catcgggaca tcaaacctgg gaacatcatg cgcttggtgg gcgaggaggg	480
gcagagcatc tataagctgt ctgacttcgg ggctgcccgc aagctggacg atgatgagaa	540
gtttgtttct gtctatggta cagaggaata cctgcaccct gacatgtatg agcgtgcagt	600
gctgcgcaaa ccccagcaaa aggcatttgg tgtgactgtg gatctctgga gtattggggg	660
gacctgtac cacgcagcca caggcagtct gcccttcac cccttcggtg ggccccggcg	720
caacaaagag atcatgtaca gaatcaccac agagaagcca gccggggcca tttcagggac	780
tcagaagcag gaaaatggtc ccttgagggt gagctacagc ctccccatca cctgtagact	840
gtccatgggg ctgcagaacc agctgggtgcc catcctggcc aacatcctgg aggtggaaga	900
ggataagtgc tggggctttg atcagttctt cgcggagacc agtgacattc tgcagcgaac	960
ggtcatccac gtcttttccc taccacaggc cgttttgcat catgtctaca tccacgcca	1020
caacacgatt gccatctttt tggaggctgt atatgagcag accaacgtga ccccaaaca	1080
ccaggagtac ctcttcgagg gtcacccttg tgccttgag ccaagcctct cagcccagca	1140
catcggccac acagctgcca gcagccctct aactctgttc agcatgtcca gcgacacacc	1200
taaggggctg gccttcaggg accctgctct ggatgtccca aagttcgtcc ctaagggtga	1260
cctacaggcc gattacagca cagctaaggg ggtgctgggc gctggctacc aggccctgtg	1320
gctggcgcg gtcttgctgg atggacaggc gttgatgctt cgggggttac attgggtcct	1380
ggaggtgctt caggacacgt gccagcagac actggaggct acacggacag ccctcctcta	1440
cctcggcagc agcctgggca ctgaaagggt cagcagtgga tcggggatgc ctgacgtcca	1500
ggaacgaaag gaggccacag agctaagaac caggctgcag actctctcag agatcctgtc	1560
taaatgttcc cacaatgtca cagaaacca aaggagcctg agctgtctgg gtgaagagct	1620
tttaaagaac cgggaccaga ttcattgagga taacaaaagt atccagaaga ttcagtgttg	1680
tttgacaag atgcacttca tctacaaaca gttcaagaaa tccaggatga ggccagggct	1740
cagctacaat gaggagcaga tccacaagct ggataaggta aatttcagtc atctagccaa	1800
gaggctgctg cagggtgtcc aggaggagtg tgtgcagacg tatcaggtgt cgctgggtcac	1860

acacggcaag cggaatgaggc aggtgcagag ggcccagaac cacctgcac tcattggcca	1920
ctctgtggcc acctgtaact cggaagcccg gggagcccag gagagtctga acaagatctt	1980
tgatcagctc ctcttggaac gagcttccga acagggagct gaggtgtcac cgcaacctat	2040
ggctcctcat cccggccctg atccgaagga cctgggtctt cacatgcagg agctttgtaa	2100
tgatatgaag ctattggcct ttgatctcca ggacaacaac cgactcatcg aacggttaca	2160
tagagttcca tcggcaccag atgtctgagc tccctggggg ttcacaaggc actcagaagc	2220
aatagaaaca ttcataattgt acccctacac tgtgagacca aattcagggc aagtcttggt	2280
tccatctcac tagcctacct cctcttggc cattggccat tggccaacaa actagcatta	2340
ctttgactgt cctcttggga agcagctagg acagggactc ctggccaicc caggcagtat	2400
ctacagaaga gaccatgcgg ctaccacagc cttatcaaga caccaagact gttcttcctt	2460
accaggctc tggaggtctg gtcttggaaa gaaaaggctc agccctctca cgctttgcac	2520
ttcccaggac cagcaggcat ctctgtggc ttctcctgcc tctccagggt gctggatcag	2580
aatgcttatt ctctgttgtt tcctgtgctg ttctctgagt gtcccatcc cctggcctca	2640
ggcaaccac aaacggcccc tctgtgcttg gtctagatgc acctgcattt gagaaagtgg	2700
gtggttgagg ctaactgctg gtgctttgag gattctcctt gaccttttct ccgaggaacg	2760
cttggttcta agaaacagct ggtcagtatc aaccacagcc atgctaactg gacagatgtt	2820
ggaacccaaa gtcctaagga gagagcaggc ctgcaccttc agacatggaa taaatacatc	2880
gccttttctg tttaaaaaaa aaaaaaaaaa	2910

<210> 4

<211> 717

<212> PRT

<213> Mouse

Met Gln Ser Thr Thr Asn Tyr Leu Trp His Thr Asp Asp Leu Leu	15
Gly Gln Gly Ala Thr Ala Ser Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Lys	30
Ser Gly Glu Val Val Ala Val Lys Val Phe Asn Ser Ala Ser Tyr	45
Arg Arg Pro Pro Glu Val Gln Val Arg Glu Phe Glu Val Leu Arg	60
Arg Leu Asn His Gln Asn Ile Val Lys Leu Phe Ala Val Glu Glu	75
Thr Gly Gly Ser Arg Gln Lys Val Leu Ile Met Glu Tyr Cys Ser	90

Ser Gly Ser Leu Leu Ser Val Leu Glu Asp Pro Glu Asn Thr Phe	105
Gly Leu Ser Glu Glu Glu Phe Leu Val Val Leu Arg Cys Val Val	120
Ala Gly Met Asn His Leu Arg Glu Asn Gly Ile Val His Arg Asp	135
Ile Lys Pro Gly Asn Ile Met Arg Leu Val Gly Glu Glu Gly Gln	150
Ser Ile Tyr Lys Leu Ser Asp Phe Gly Ala Ala Arg Lys Leu Asp	165
Asp Asp Glu Lys Phe Val Ser Val Tyr Gly Thr Glu Glu Tyr Leu	180
His Pro Asp Met Tyr Glu Arg Ala Val Leu Arg Lys Pro Gln Gln	195
Lys Ala Phe Gly Val Thr Val Asp Leu Trp Ser Ile Gly Val Thr	210
Leu Tyr His Ala Ala Thr Gly Ser Leu Pro Phe Ile Pro Phe Gly	225
Gly Pro Arg Arg Asn Lys Glu Ile Met Tyr Arg Ile Thr Thr Glu	240
Lys Pro Ala Gly Ala Ile Ser Gly Thr Gln Lys Gln Glu Asn Gly	255
Pro Leu Glu Trp Ser Tyr Ser Leu Pro Ile Thr Cys Arg Leu Ser	270
Met Gly Leu Gln Asn Gln Leu Val Pro Ile Leu Ala Asn Ile Leu	285
Glu Val Glu Glu Asp Lys Cys Trp Gly Phe Asp Gln Phe Phe Ala	300
Glu Thr Ser Asp Ile Leu Gln Arg Thr Val Ile His Val Phe Ser	315
Leu Pro Gln Ala Val Leu His His Val Tyr Ile His Ala His Asn	330
Thr Ile Ala Ile Phe Leu Glu Ala Val Tyr Glu Gln Thr Asn Val	345
Thr Pro Lys His Gln Glu Tyr Leu Phe Glu Gly His Pro Cys Val	360
Leu Glu Pro Ser Leu Ser Ala Gln His Ile Ala His Thr Ala Ala	375
Ser Ser Pro Leu Thr Leu Phe Ser Met Ser Ser Asp Thr Pro Lys	390
Gly Leu Ala Phe Arg Asp Pro Ala Leu Asp Val Pro Lys Phe Val	405
Pro Lys Val Asp Leu Gln Ala Asp Tyr Ser Thr Ala Lys Gly Val	420
Leu Gly Ala Gly Tyr Gln Ala Leu Trp Leu Ala Arg Val Leu Leu	435
Asp Gly Gln Ala Leu Met Leu Arg Gly Leu His Trp Val Leu Glu	450
Val Leu Gln Asp Thr Cys Gln Gln Thr Leu Glu Val Thr Arg Thr	465
Ala Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Ser Leu Gly Thr Glu Arg Phe Ser	480
Ser Gly Ser Gly Met Pro Asp Val Gln Glu Arg Lys Glu Ala Thr	495
Glu Leu Arg Thr Arg Leu Gln Thr Leu Ser Glu Ile Leu Ser Lys	510
Cys Ser His Asn Val Thr Glu Thr Gln Arg Ser Leu Ser Cys Leu	525

Gly Glu Glu Leu Leu Lys Asn Arg Asp Gln Ile His Glu Asp Asn	540
Lys Ser Ile Gln Lys Ile Gln Cys Cys Leu Asp Lys Met His Phe	555
Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Lys Ser Arg Met Arg Pro Gly Leu Ser	570
Tyr Asn Glu Glu Gln Ile His Lys Leu Asp Lys Val Asn Phe Ser	585
His Leu Ala Lys Arg Leu Leu Gln Val Phe Gln Glu Glu Cys Val	600
Gln Thr Tyr Gln Val Ser Leu Val Thr His Gly Lys Arg Met Arg	615
Gln Val Gln Arg Ala Gln Asn His Leu His Leu Ile Gly His Ser	630
Val Ala Thr Cys Asn Ser Glu Ala Arg Gly Ala Gln Glu Ser Leu	645
Asn Lys Ile Phe Asp Gln Leu Leu Leu Asp Arg Ala Ser Glu Gln	660
Gly Ala Glu Val Ser Pro Gln Pro Met Ala Pro His Pro Gly Pro	675
Asp Pro Lys Asp Leu Val Phe His Met Gln Glu Leu Cys Asn Asp	690
Met Lys Leu Leu Ala Phe Asp Leu Gln Asp Asn Asn Arg Leu Ile	705
Glu Arg Leu His Arg Val Pro Ser Ala Pro Asp Val ***	717

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、LPSによる刺激前（-）と刺激後（+）のIKK-iのmRNA発現の誘導のノザンブロット解析の結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG3PDHを用いた場合を示す。

【図2】

図2は、IKK-iのLPS刺激後のmRNA発現を時間の経過によりノザンブロット解析を行った結果を示す図面に代わる写真である。図の下段はG3PDHを用いた場合を示す。

【図3】

図3は、ヒトIKK-iとマウスIKK-iのアミノ酸配列の比較を示す。図中の長方形で囲まれた部分は同一の配列を示し、[]の部分はキナーゼドメインを示し、*印はロイシンジッパードメインを示す。

【図4】

図4は、IKK-iとIKK- α 、IKK- β のアミノ酸配列の比較を示す。

図中のバックをグレーに配色した部分は同一の配列を示し、[]の部分はキナーゼドメインを示し、長方形で囲んだ部分はアクチベーションループを示し、*印はキナーゼ活性に重要であると考えられるアミノ酸残基を示す。

【図5】

図5は、ノザンブロット解析による各臓器におけるIKK- α の発現を示した図面に代わる写真である。

【図6】

図6は、ノザンブロット解析によるB-細胞とT-細胞におけるIKK- α の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はG3PDHを用いた場合を示す。

【図7】

図7は、ノザンブロット解析によるマウスの腫瘍株におけるIKK- α の発現を示した図面に代わる写真である。図の下段はエチジウムブロマイドで染色したトータルRNAを示す。

【図8】

図8は、マウス腹腔マクロファージにおけるノザンブロット解析による種々の刺激によるIKK- α の誘導を示した図面に代わる写真である。図の下段はG3PDHを用いた場合を示す。

【図9】

図9は、IKK- α の強制発現によるNF- κ Bレポーター遺伝子の活性化の結果を示したものである。図の下段は、タンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノブロットにより評価した結果を示す図面に代わる写真である。

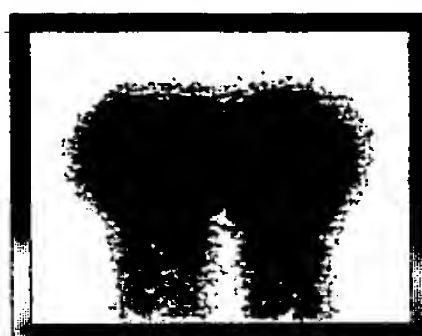
【図10】

図10は、インビトロでのIKK- α によるI κ B- α のリン酸化の結果を示した図面に代わる写真である。図の下段は、タンパク量を抗FLAG抗体(M2)によるイミュノブロットにより評価した結果である。

【書類名】 図面

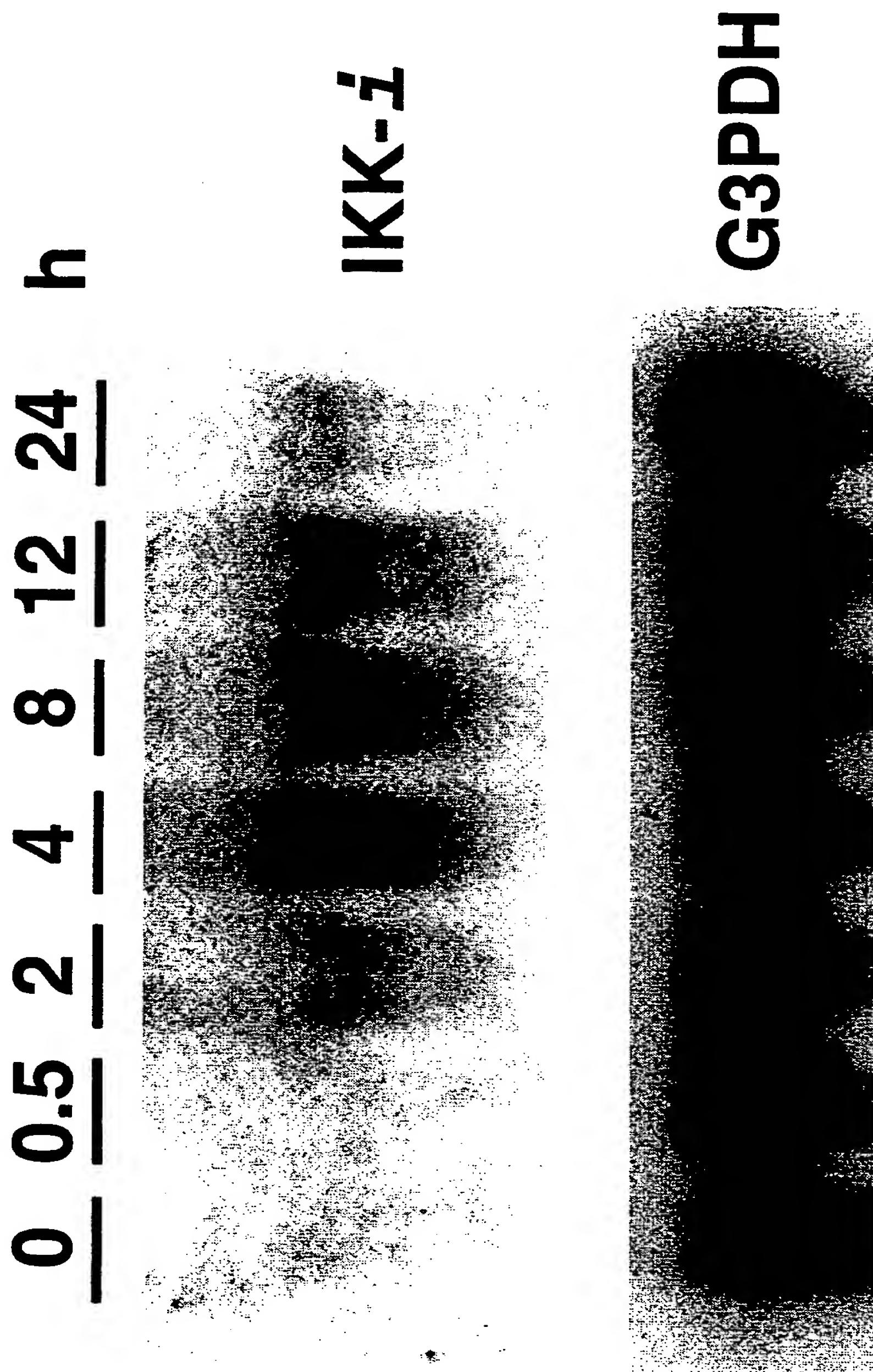
【図 1】

LPS stimulation 二 +



G3PDH

【図2】



【図3】

h i k k - i	1: M Q S T A N Y I W H T D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E L V A V K V F N T T S Y L R P R E V Q V R E F E V L R K L N H Q N I V K L F A V E E	75
m i k k - i	1: M Q S T A N Y I W H T D D L L G Q G A T A S V Y K A R N K K S G E V V A V K V F N S A S Y R R P P E V Q V R E F E V L R R L N H Q N I V K L F A V E E	75
h i k k - i	76: T G G S R Q K V L V M E Y C S S G S L L S V L E S P E N A F G L P E D E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q	150
m i k k - i	76: T G G S R Q K V L I M E Y C S S G S L L S V L E D P E N T T F G L S E E E F L V V L R C V V A G M N H L R E N G I V H R D I K P G N I M R L V G E E G Q	150
h i k k - i	151: S I Y K L T D F G A A R E L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q K A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G	225
m i k k - i	151: S I Y K L S D F G A A R K L D D D E K F V S V Y G T E E Y L H P D M Y E R A V L R K P Q K A F G V T V D L W S I G V T L Y H A A T G S L P F I P F G	225
h i k k - i	226: G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I A G A Q R R E N G P L E W S Y T L P I T C Q L S L G L Q S Q L V P I L A N I L E V E Q A K C W G F D Q F F A	300
m i k k - i	226: G P R R N K E I M Y R I T T E K P A G A I S C T Q K Q E N G P L E W S Y S L P I T C R L S M G L Q N Q L V P I L A N I L E V E E D K C W G F D Q F F A	300
h i k k - i	301: E T S D I L Q R V V V H V F S L S Q A V L H H I Y I H A H N T I A I F Q E A V H K Q T S V A P R H Q E Y L F E G H L C V L E P S V S A Q H I A H T A	375
m i k k - i	301: E T S D I L Q R T V I H V F S L P Q A V L H H V Y I H A H N T I A I F L E A V Y E Q T N V T P K H Q E Y L F E G H P C V L E P S L S A Q H I A H T A	375
h i k k - i	376: S S P L T L F S - T A - I P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y N T A K G V L G A G Y Q A L R L A R A L L D G Q E L M F R G L H W V M E	448
m i k k - i	376: S S P L T L F S M S S D T P K G L A F R D P A L D V P K F V P K V D L Q A D Y S T A K G V L G A G Y Q A L W L A R V L L D G Q A L M L R G L H W V L E	450
h i k k - i	449: V L Q A T C R R T L E V A R T S L L Y L S S S L G T E R F S S V A G T P E I Q E L K A A A E L R S R L R T L A E V L S R C S Q N I T E T Q E S L S S L	523
m i k k - i	451: V L Q D T C Q Q T L E V T R T A L L Y L G S S L G T E R F S S G S G M P D V Q E R K E A T E L R T R L Q T L S E I L S K C S H N V T E T Q R S L S C L	525
h i k k - i	524: N R R L V K S R D Q V H E D - R S I Q Q I Q C C L D K M N F I Y K Q F K K S R M R P G L G Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V	597
m i k k - i	526: G E E L L K N R D Q I H E D N K S I Q K I Q C C L D K M H F I Y K Q F K K S R M R P G L S Y N E E Q I H K L D K V N F S H L A K R L L Q V F Q E E C V	600
h i k k - i	598: Q R Y Q A S L V T H G K R M R V V H E T R N H L R L V G C S V A A C N T E A Q G V Q E S L S K L L E E L S H Q L L Q D R A K G A Q A S P P I A P Y F	672
m i k k - i	601: Q T Y Q V S L V T H G K R M R Q V Q R A Q N H L H L I G H S V A T C N S E A R G A Q E S L N K I F D Q L - - L L D R A S E Q G A E V S P O P M A P H F	673
h i k k - i	673: S P T R K D L L L H M Q E L C E G M K L L A S D L L D N N R I I E R L N R V P A P P D V	716
m i k k - i	674: G P D P K D L V F H M Q E L C N D M K L L A F D L Q D N N R L I E R L H R V P S A P D V	717

特平 10-30408

【図4】

hikk-i 1 1 QSTANYL-----WHTDDLIGQATASVYKARKKSGELVAVKVFNTTSYLPRVQVR EFVLRLKLNHONIVKLFVET-----GGRQKQVLEMEYCS 90
hikk-beta 1 1 MSWSPSLTQTCGAWEMKERLCTGGFGNVI RWHNQETGEOIAIKQCRQELSPRNRERWCL EIQIMRRLTHPNVVAARDVPEGMQNDLPDLPLAMEYCO 100
hikk-alpha 1 1 MERPPGLRPGAGGFWEMRERLGIGGFGNVCLYQHRELDLKIAIKSCRLELSTKNRERWCH EIQIMKKNHANVAVKACDVPEELNIII-HDVPLPLAMEYCS 99

hikk-i 91 91 SCSLSVLES PENAFGLPEDEFLVLRVAVAGMNHRENG IVHRDIKPGNIMRLVGEEO SIYKLTDFGAARELDDDEK FVSIVYGTTEEY LHPDMYERAVL 190
hikk-beta 101 101 GGDLRKYLNQ FENCCGLREGA ILLTLLSDIASALRYLHENR I IHRDLKPENIV-LQGEQR LTHKIIIDLG YAKELDQGS LCTSFVGTLOQYIHAPELLE----- 195
hikk-alpha 100 100 GGDLRKLNK PENCCGLKES QILSLSDIGSGIRYLHENK I IHRDLKPENIV-LQDVGCK I IHKIIIDLG YAKDV DQGS LCTSFVGTLOQYIHAPELFE----- 194

hikk-i 191 191 RKPOQKAFGVTVDLNSIGVTLYHAATGSLPFI P-----FGPRRNKEIM YRITTEKPA GAI A-GAQRRENGPEWSYTL PITCQLSLGLQSQLVPILAN 283
hikk-beta 196 196 ---QOKYTVTVDYNSFGTLAFECITGFRPFLPNWQPVQWHSKVRQKSEV DIVSEDLNG TVKFS SLPY PNNLNSVLAERLEKWLQMLMWHPRQRGT- 290
hikk-alpha 195 195 ---NKPYTATVDYNSFGTMVFECIAGYRPFLLHLPFTWHEKIKKDPK CIFACEEMSG EVRFS SLPY PNNLNSVLAERLEKWLQMLMWHPRQRGT- 290

hikk-i 284 1-LEVEQAKCNGFDQFFAETSDILQRVVHVFSLSQAVLHHIYIHAHTIAIFQEA VHKQTSVAPRHQEYLFEGHLCVLEPSVSAQHIAHTTASSPLT-- 380
hikk-beta 291 -DPTYGPNGC-----FKALDDILNLKLVHILNMVTGTHIHTYPTVEDESLQSLKARIQQD TGIPEDQELIQEAGLALIPDKPATQCISDGKLNEGHTLD 383
hikk-alpha 291 VDLTLKQPRC-----FVLM DHIILNLKIVHILNMVTSAK I I SFLPPDESJHLSQSRTERE TGINTGSELSETGISLDPKRPASQCV-----LDGVRGCD 380

hikk-i 381 ----LFS---TAIPKGLAFRDPALDVPKFVPKVDLQADYNTAKGLGAGYQALRLARA-----LLDGQELMFRGLHWV---MEVLQATCRRTLEVARTSL 465
hikk-beta 384 MDLVFLPBN SKITVETQISPRQPESVSCIQEPKRNIAF FQLRKVNQGVVH SIQTLKED CNRLQOQQRAMNNDLRNNSCLSKMKNMSMASMSQQLKAKL 483
hikk-alpha 381 SYMVYLFDKSKTVYEGPFASRSLSDCVNI VQDSKIQLPI IQLRKVWAEAVHVVSGLKED YSRLFQOQRAANLSLRYNANETKMKNTLISASQQLKAKL 480

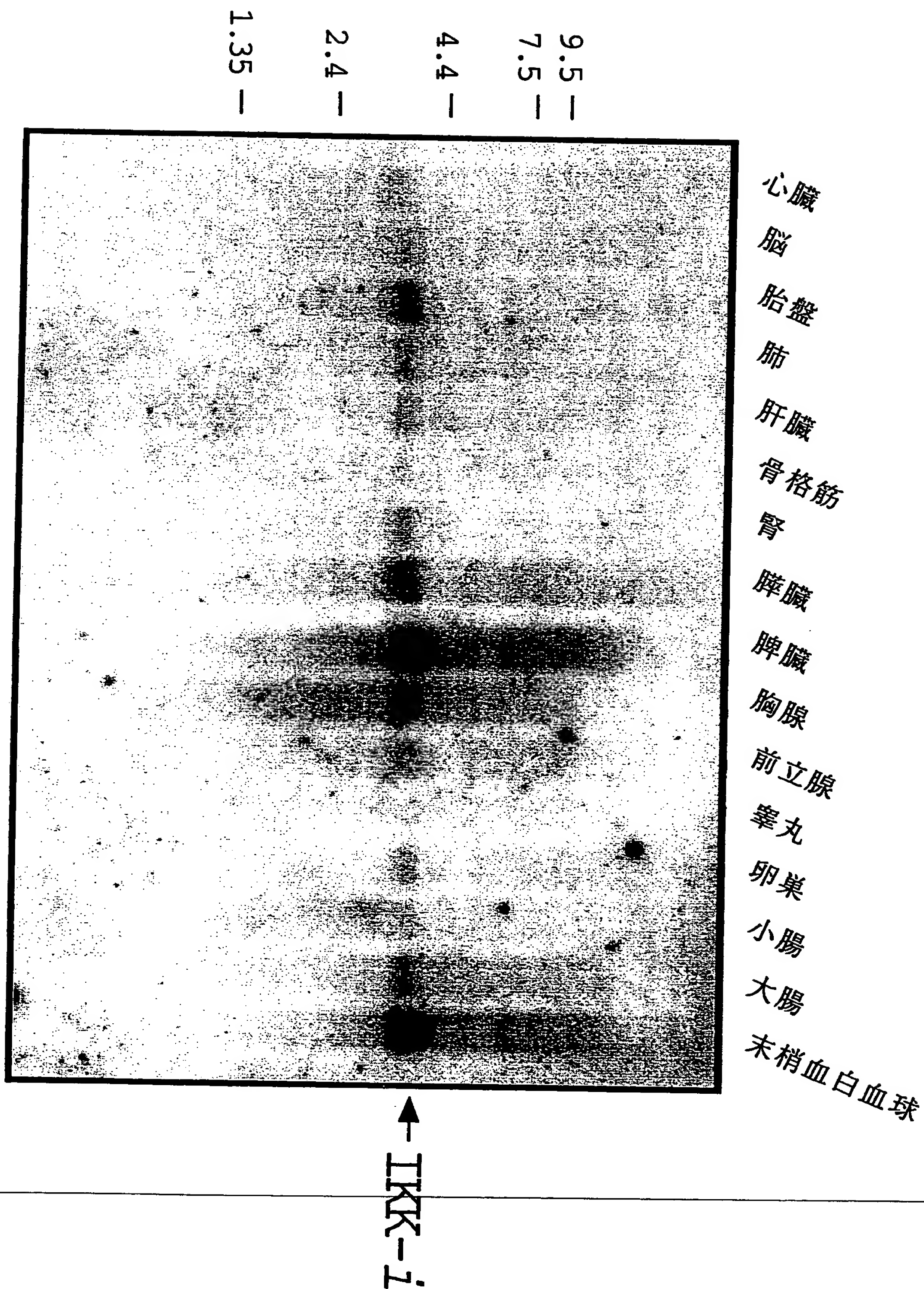
hikk-i 466 LYLSSS--LGTERFSSVAGTPEIQELKAAAEELSRRLTLAEVLSRCSON--ITETQESLS SLNRELVKSRDQVHEDRSIQIQCCLDKMNFIYKQFK-KS 560
hikk-beta 484 DFFKTSIQIDLEKYSEQTEF----GITS DKL LAM-REMEQAVELCGREN EVKLLVERMMALQTDIVDQSPMGRKQGGTLDDEEQARELYRRLREKP 578
hikk-alpha 481 EFFHKSIQLDLERYSEQMTY-----GISSEKMLKAW-KEMEEKAIHYAEVGVIGYLEDQIMSLHAEIMELQKSPYGRRQGDLMESLEQRAIDLKQKLRP 575

hikk-i 592 RMRPGLQYNEEQIH-----KLDKVNFSHIAK-----RLIQVFQEECVQKYQASL VTHGKRMV VVHETRN-----HRLVGC SVAAACNTEAQGVQE 640
hikk-beta 579 RQORTEGDSQEMVRL LLOAIQSFEKKVRVIYTQLSKTVVCKQKALELPK--VEEVVSLMNEDEKTVVRLQEKROKELMNLKIACSK-----VRG 667
hikk-alpha 576 SDH-SYSDSTEMVKIIVHTVQSQDRVLKELFGHLSKLLGCKQKIIDL LPK--VEVALSNI KEADNTVMFMQCKRQKEIWHLLKIACTQSSARSL-----VGS 669

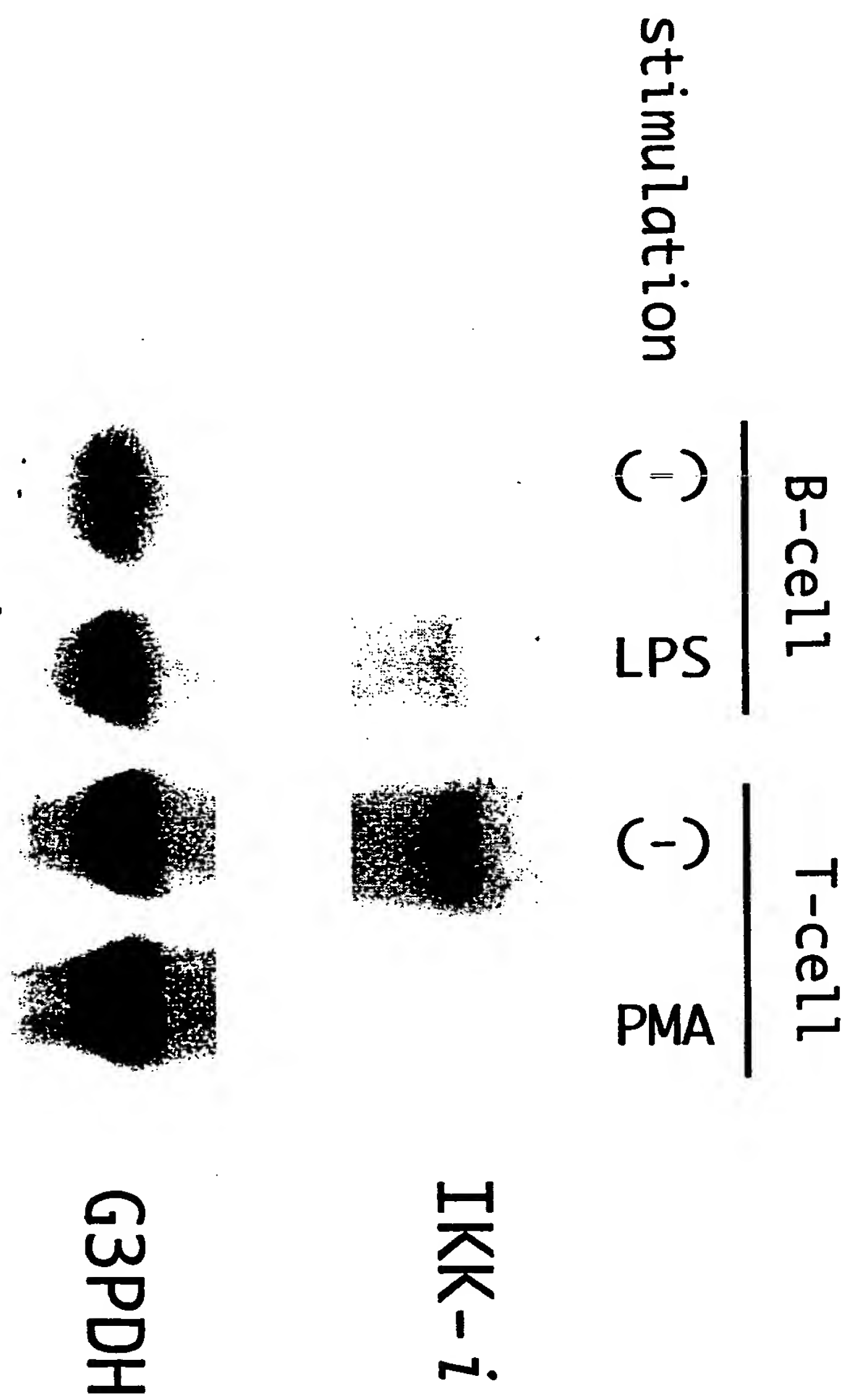
hikk-i 641 SLSKLLEELSHQLQDRAKGAQASPPPIAPYSPTRK--D LLLHMQELCEGM--KLLASD LLDNNRIIERLNRVPAPPD-----V 716
hikk-beta 668 PVSGSPDSMNASRLSQPGQLMSQPSTASNSLPEPAKKSEELVAEHNLC-TLL ENAIQDTVREQDQSFTALDWSNLQTEEEHSCLEQAS 756
hikk-alpha 670 SLEGAVTPTQTSAWLP-PTSA EHDHSLSCVVTPODGETSAQMIENLN-CLGHLSTIIEA NEEQGNMNL DWSWL-----TE 745

特平 1 0 - 3 0 4 0 8 5

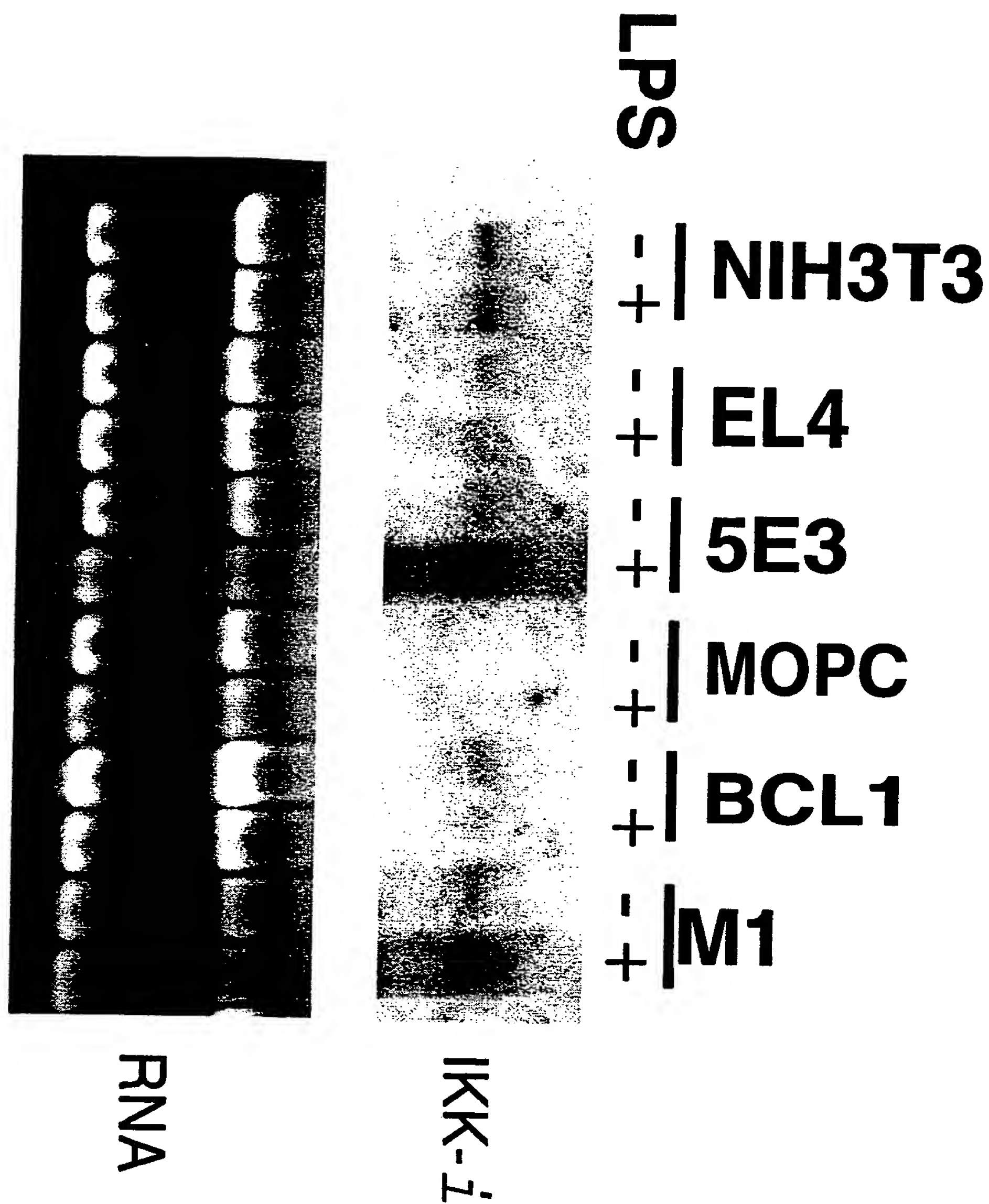
【図5】



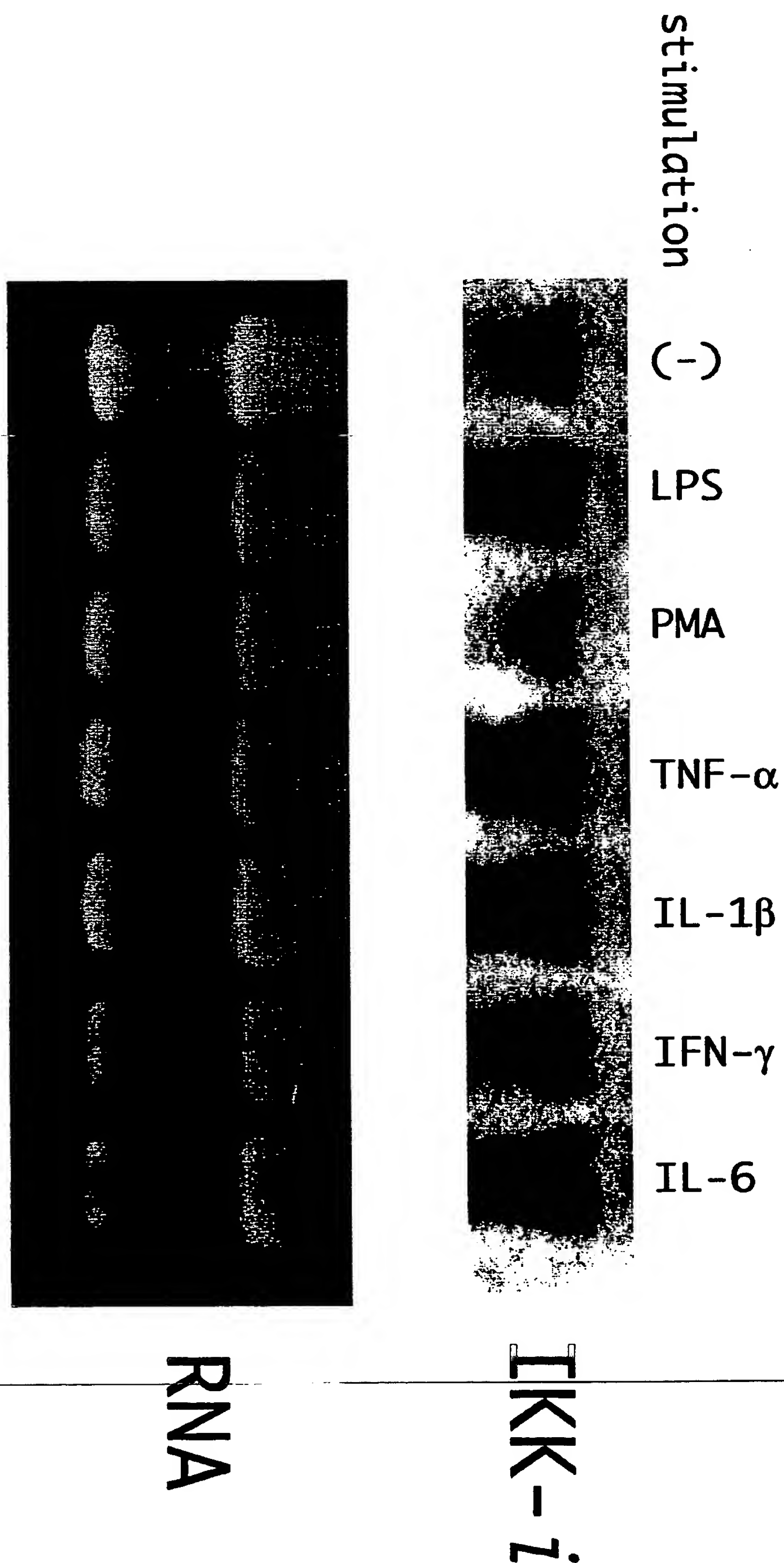
【図 6】



【図 7】

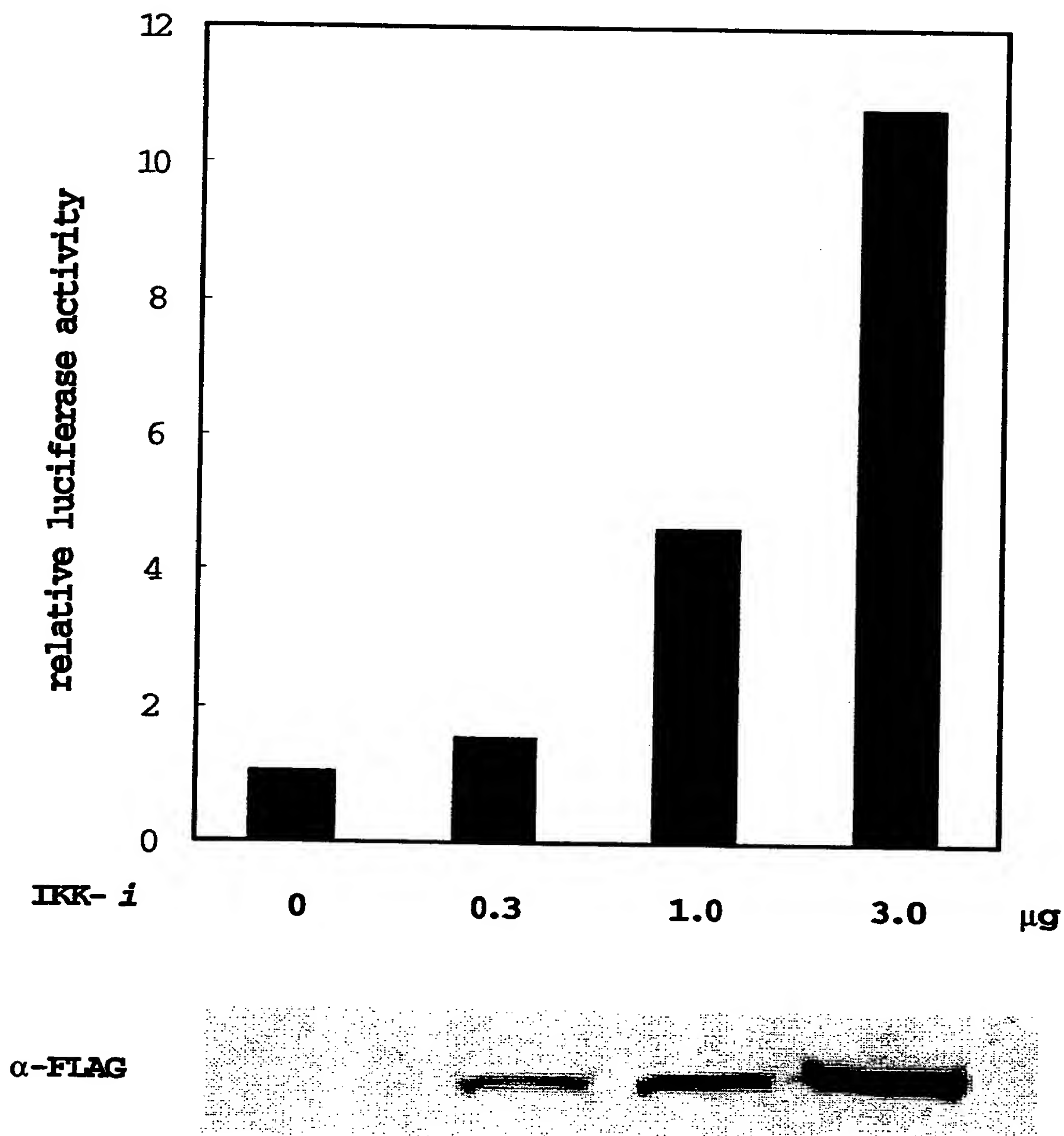


【図 8】

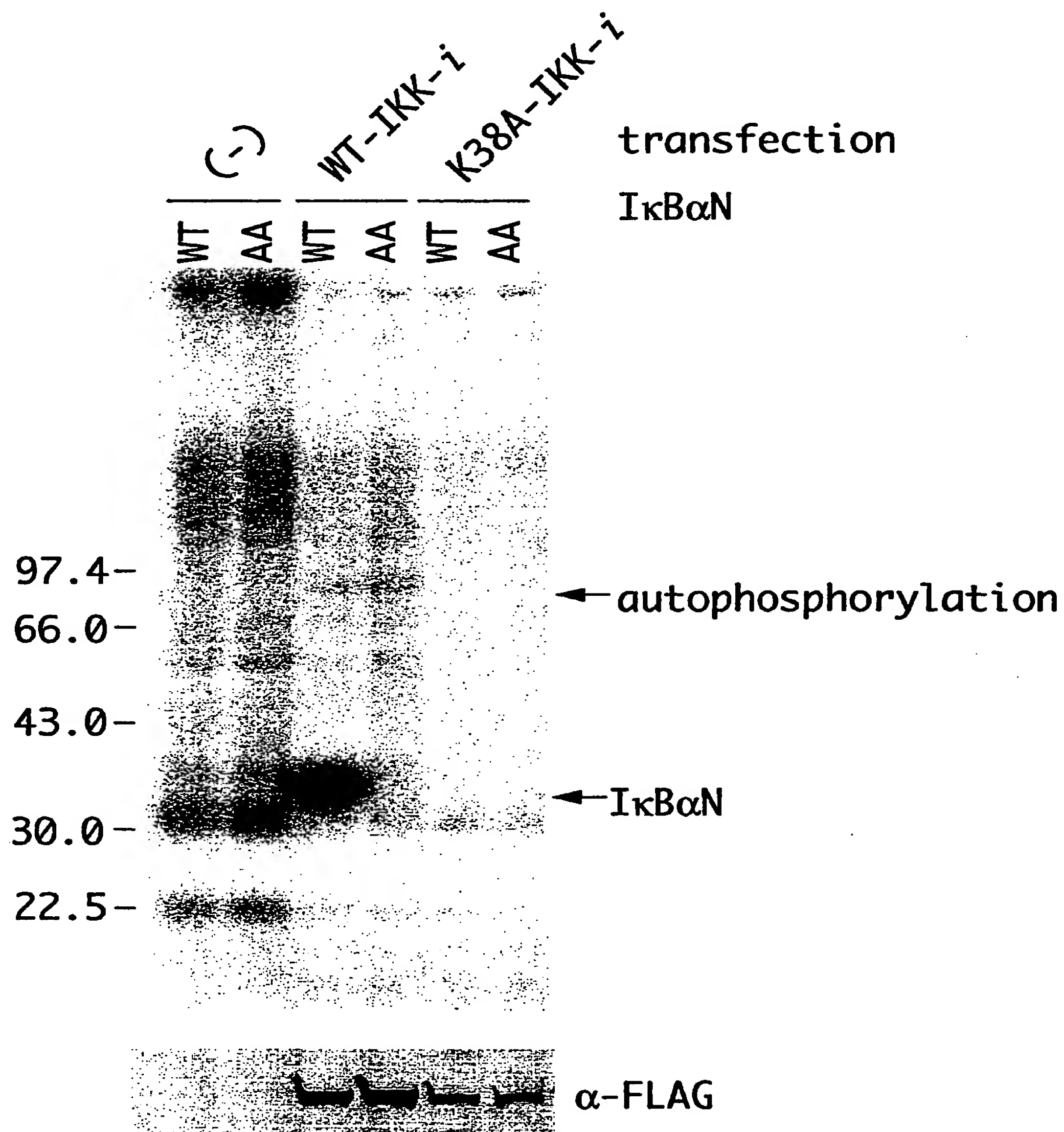


【図9】

over expression of IKK-*i* activates NF- κ B



【図 1 0】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、それをコードする遺伝子及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

【解決手段】 本発明は免疫応答に関わる種々の遺伝子の発現を制御する転写因子NF- κ Bを活性化することができる新規のセリン／スレオニンキナーゼである新規I κ BキナーゼIKK-i、その遺伝子及び医薬組成物に関する。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

396020800

【住所又は居所】

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】

科学技術振興事業団

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102668

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9

階 たくみ特許事務所

【氏名又は名称】

佐伯 憲生

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団